

A posztkondicionálás hatásának vizsgálata vese iszkémia-reperfúziót követően metabolikusan károsított patkánymodellben

Egyetemi doktori (Ph. D.) értekezés tézisei

Dr. Miklós Zsanett Éva

Témavezetők: Dr. Jancsó Gábor, Dr. Kürthy Mária

Programvezető: Prof. Dr. Róth Erzsébet

A Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Komoly Sámuel



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Sebészeti Oktató és Kutató Intézet

2013

TARTALOMJEGYZÉK

I. Bevezetés.....	3
II. Célkitűzések	4
III. A posztkondicionálás hatásának vizsgálata a vese iszkémia-reperfúziós károsodásaira hiperkoleszterinemiában	4
IV. Az iszkémiás posztkondicionálás hatásának vizsgálata vese iszkémia-reperfúziót követően 2-es típusú diabétesz mellituszban	11
V. Az iszkémiás és farmakológiai posztkondicionálás hatása a vese iszkémia-reperfúziós károsodásaira streptozotocin-indukált diabétesz mellituszban	17
VI. Következtetések	21
VII. Összefoglalás, új eredmények	23
VIII. Köszönetnyilvánítás	25
XI. Publikációs jegyzék.....	26

I. BEVEZETÉS

A sebészeti gyakorlatban komoly problémát jelent a transzplantációt és hasi érműtéseket kísérő súlyos szöveti **iszkémia-reperfúziós (IR) károsodás**, mely nemcsak az érintett szerv, hanem távoli szervek, gyakran az egész szervezet integritását is érinti. Érműtétek, szervátültetés során az iszkémia-reperfúzió okozta károsodás csökkentése és annak megelőzése kiemelt klinikai jelentőséggel bír. Az IR károsodás okozta elváltozások okainak és mechanizmusának ismerete hozzásegíthet az egyre hatékonyabb védelmi stratégiák kidolgozásához, melyek segítségével a műtéseket követően javíthatók a betegek életkilátása és túlélése.

A reperfúziós károsodás csökkentésének egyik legígéretesebb kísérletes lehetőségét, az iszkémiás **prekondicionálást** mintegy 30 éve fedezték fel. A tervezett iszkémia-reperfúzióval járó beavatkozások (érrekonstrukció, szervtranszplantáció, koronária bypass) esetében a prekondicionálás a klinikum számára meglepően hatékonynak bizonyult, azonban terápiás használhatóságát jelentősen beszűkíti, hogy akut érelzáródások (embólia, trombózis) esetében nem kivitelezhető.

Az első áttörést Vinten-Johansen és munkatársai érték el 2002-ben azáltal, hogy megfigyelték kísérletes körülmények között a **posztkondicionálás** jelenségét. A posztkondicionálás tartósan fennálló iszkémiát követően a reperfúziós periódus kezdetén alkalmazott rövid intermittáló hipoxiás stimulusokat jelenti. Az iszkémiás posztkondicionálás által kiváltott endogén adaptáció a jelenleg ismert leghatékonyabb védelem a reperfúziós károsodásokkal szemben. A posztkondicionálással kapcsolatos vizsgálatok középpontjában eddig az iszkémiás szívbetegség és a módszer kardioprotektív hatása állt. Érsebészetben, alsó végtagi IR károsodás tekintetében 2007-től több munkacsoport végez vizsgálatokat.

A **cukorbetegség (diabétesz mellitusz)** és hipertónia növelik az IR okozta károsodás kockázatát. A diabétesz mellitusz a fejlett ipari országok lakosait sújtó vezető kórokok és halálokok egyike. Kialakulásáért az inzulin abszolút vagy relatív hiánya okolható, melyben a működőképes béta-sejtek csökkent mennyisége és/vagy a szövetek inzulinrezisztenciája a fő tényező. Leírták, hogy genetikusan diabéteszes ob/ob egereken miokardiális infarktust követően a posztkondicionálás védő hatása nem érvényesült.

Kevés preklinikai vizsgálat történt a posztkondicionálás alkalmazásával a vese IR károsodásának csökkentésére, míg **metabolikus eltérések jelenlétében** tudomásunk szerint még nem vizsgálták.

II. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során a vesét érintő sebészeti beavatkozásokat kísérő iszkémia-reperfúziós károsodást modelleztük metabolikusan egészséges, hiperkoleszterinemiás és diabéteszes patkányokban. Az iszkémia-reperfúziós károsodást próbáltuk csökkenteni iszkémiás és farmakológiai posztkondicionálással.

I. Munkánk első részében célkitűzésünk: hiperkoleszterinemiás állatok veséjén iszkémia-reperfúziót (45 perc iszkémia- 120 perc reperfúzió) követően iszkémiás posztkondicionálás létrehozása; vesehilus-okklúziót követően iszkémiás posztkondicionálás alkalmazása; és a kialakuló oxidatív stressz és gyulladásos válaszreakciók mértékének vizsgálata.

II. Munkánk második részében célkitűzésünk: 2-es típusú diabétesz mellitusban a patkányok veséjén iszkémia-reperfúziót (90 perc iszkémia- 240 perc reperfúzió) követően iszkémiás posztkondicionálás létrehozása; májszövetben az iszkémiás posztkondicionálás hatását kívántuk mérni; az orális glükóz tolerancia teszt (OGTT) során vizsgálni a szérumglükóz-, inzulin- és TNF- α -szintet; vizsgálata vérben, szérumban és májban a kialakuló oxidatív stressznek és gyulladásos válaszreakcióknak.

III. Kísérletünk harmadik részében célkitűzésünk: 1-es típusú diabétesz mellitusban szenvedő állatok veséjében az iszkémia-reperfúziós (45 perc iszkémia- 120 perc reperfúzió) károsodások vizsgálata; az iszkémiás és az inzulinnal történő farmakológiai posztkondicionálás hatásának vizsgálata. Célunk: a vese károsodásának vizsgálata, továbbá az egyik fő védő útvonalat legátolva (a PI3K/Akt útvonal gátlása Wortmanninnal) a posztkondicionálás hatásának csökkentése; az iszkémia-reperfúziós károsodás vizsgálata szérumban és perifériás szövetekben.

III. A POSZTKONDITIONÁLÁS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA A VESE ISZKÉMIA-REPERFÚZIÓS KÁROSODÁSAINA HIPERKOLESZTERINÉMIÁBAN

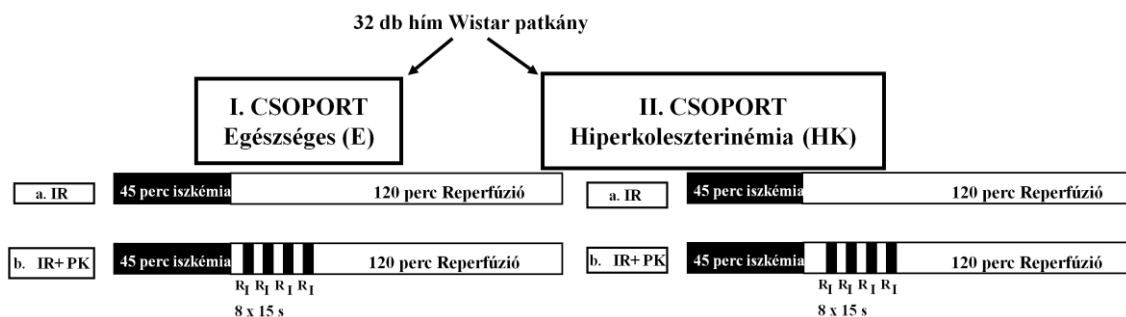
1. Célkitűzések

Célunk az iszkémiás-reperfúziós károsodás hatását vizsgálni 45 perc vese iszkémiát és 120 perc reperfúziót követően egészséges és hiperkoleszterinemiás patkánymodellben. Az iszkémiás posztkondicionált csoportban a reperfúzió kezdeti fázisában 4 ciklus 15 másodperces reperfúzió és 15 másodperces reokklúziót alkalmaztunk. Ezen a modellen az állatok endogén adaptációs mechanizmusainak indukálását, az iszkémiás posztkondicionálás hatását kívántuk vizsgálni a reperfúziót követően teljes vérben, szérumban és veseszövetben. A metabolikus státusz jellemzésére glükóz, koleszterin, triglicerid, inzulin szinteket mértünk;

a vesefunkció meghatározására szérumkarbamid-, kreatinin-szintet mértünk; az oxidatív stressz mértékét a lipidperoxidáció (szérumperoxid-szint) mérésével kívántuk jellemezni. A reperfüzió indukálta gyulladásos válaszreakció jellemzése a TNF- α -szint meghatározásával, és a fehérvérsejtek indukálta szabadgyök-termelésével történt. Az iszkémiás poszt kondicionálás hatását fénymikroszkópos (HE, PAS, TNF- α immunhisztokémia) technikákkal kívántuk vizsgálni veseszövetben.

2. Anyag és módszerek

A vizsgálatokhoz 32 darab felnőtt, hím Wistar laboratóriumi patkányt használtunk. A patkányokat két csoportra osztottuk. Az egyik csoportot (kontroll) patkánytápon [E], a másikat (hiperkoleszterinémias) 1,5 %-os koleszterin tartalmú diétán tartottuk [HK].



A hiperkoleszterinémia kialakulása után kezdtük meg a műtéteket. A narkózist intraperitoneálisan bólusban adott ketamin (Calypsol, 500 mg ketaminium chloratum ampullánként) és diazepam (Seduxen, 10 mg diazepam ampullánként) 1:1 arányú keverékével végeztük (0,2 ml/ 100 tsg). Laparotómiát követően mobilizáltuk a mezenterialis gyököt, meggyőződünk a vesék kb. azonos nagyságáról, illetve azonosítottuk az ellátó ereket (a. és v. renalis), majd mindkét vesét atraumatikus mikroklippel 45 percre a keringésből kirekesztettük. Az iszkémiás periódus alatt az állatok hasfalát a túlzott folyadékvesztés elkerülése érdekében átmenetileg zártuk. Mindkét csoportot további alcsoportra osztottuk (n=8): 1) az egyik alcsoportnál az iszkémiát követően kétórás reperfüziót [IR], 2) a másik alcsoportnál az iszkémiát követően a reperfüzió megkezdése előtt 2 perc poszt kondicionálást (15 s reperfüzió/ 15 s reokkluzió 4 ciklusban) alkalmaztunk [PK]. Mintavételre a reperfüzió végén került sor. Az állatokat exsanguináltuk, vért és szérumot használtunk a következőkben részletezésre kerülő paraméterek mérésére. Szövetteni vizsgálatra a bal vesét formalinba helyeztük.

Laboratóriumi vizsgálatok:

Glükóz, koleszterin, triglicerid, karbamid, kreatinin meghatározása

Standard enzimatis, kolorimetriás módszerrel mértük (Diagnosticum Zrt, Magyarország). Az abszorbanciák és a standard koncentráció segítségével kiszámítottuk a minták szérum koncentrációját, majd az eredményeket grafikonon ábrázoltuk.

Inzulin meghatározása

A széruminzulin-szintjét standard ELISA módszerrel mértük (Mercodia Rat Insulin Elisa kit, Mercodia, Uppsala, Svédország). A mérés elve az ún. „szendvics ELISA”.

Oxidatív stressz

Az oxidatív stressz jellemzése a lipid peroxidok szérum koncentrációjának meghatározásával történt. A vérben az oxidatív stresszre érzékeny komponens az LDL (low density lipoprotein). Az LDL oxidációja az oxigén eredetű szabad gyökök következménye, mely során az LDL többszörösen telítetlen zsírsavláncai átalakulnak a lipidperoxidáció során lipid hidroperoxidokká. A szérumperoxid-szint mérésére az Oxystat ELISA kitet alkalmaztuk, követve a gyártó protokollját (Biomedica Medizinprodukte GmbH, Bécs, Ausztria).

A fehérvérsejtek indukált gyöktermelésének meghatározása

A leukociták forbol-12-mirisztát-13-acetáttal (PMA) indukált szabadgyök-termelését standard kinetikus luminometriás módszerrel teljes vérből mértük. A szuperoxid-anion termelés indukációjára 0,2 µg/ml PMA szolgált. A detektálás 3,33 µg/ml luminollal történt, egy Chrono-log 560-VS lumino-aggregométerrel.

A Tumor Nekrózis Faktor-alfa (TNF-α) expresszió meghatározása

A TNF-α az egyik legfontosabb proinflammatorikus citokin az iszkémia- reperfüziós károsodás patogenezisében. A citokin expresszió meghatározására szérum-TNF-α-koncentrációt mértünk szendvics ELISA módszerrel (TNF-α immunoassay kit, R&D Systems, Inc. Minneapolis, USA), követve a gyártó cég utasításait.

Morfológiai vizsgálatok:

Fénymikroszkópos vizsgálat: A bal vesét 10%-os neutrális formalinban fixáltuk, majd felszálló alkoholsorban víztelenítettük és paraffinba ágyaztuk. A vese keresztmetszete mentén készült 5µm vékony metszetek egy részét haematoxin-eosinnal (HE) festettük meg, és perjódsv-Schiff (PAS) reakciót végeztünk. Vizsgáltuk a vese minden rétegét, és a hyalincylinder mennyiségét. A proximális tubulusok értékelésére a Jablonski score-t használtuk. Vesepapilla-károsodás hipoxia során és diabétesz mellitusban gyakran jön létre, ezért kiemelten vizsgáltuk e területet.

TNF-α immunhisztológiai (IH) fénymikroszkópos vizsgálata: Immunhisztokémiai vizsgálataink TNF-α monoklonális egér ellenanyaggal történtek, mely keresztreakciót ad más rágsálók, így a patkány TNF-α-val is. A monoklonális ellenanyag a TNF-α-t termelő sejtek citoplazmáját festi. Pozitív kontrollunk granulomatózus gyulladás volt. A tubulus hám TNF-α pozitivitását 200x-os nagyítás mellett 24 látóteret a MIRAX Viewer programban értékeltünk. A pozitív és negatív sejtek arányát vizsgáltuk. Score rendszert alkalmaztunk a TNF-α pozitívítás számszerűsítésére a tubulus hámiban: nincs TNF-α = Grade 0, 20% = Grade 1, 40% = Grade 2, 60% = Grade 3, 80% = Grade 4, 100% = Grade 5.

Statisztikai analízis:

Az analízishez a Microsoft Office Excel 2007 és az SPSS 17.0 programokat használtuk az összes kísérletünkben. Az adatok ábrázolásakor a középértéket (átlag) és annak hibáját (\pm SEM-standard error of mean) tüntettük fel. Az állatmodell létrehozásakor, az egyes csoportokat Student félé t-próbával hasonlítottuk össze. A kísérleti eredményeket egyirányú varianciaanalízissel (ANOVA) a csoportokon belül Wilcoxon, a csoportok között Mann-Whitney tesztet alkalmaztuk. A különbséget akkor tekintettük szignifikánsnak, ha p érték kisebb volt, mint 0,05.

3. Eredmények

Laboratóriumi vizsgálatok eredményei: Az általunk készített tápot mindkét csoport elfogadta. A táp fogyasztás a két csoport között nem mutatott alapvető különbséget. A 1,5%-os koleszterintartalmú tápon tartott állatok szignifikánsan kevesebbet ettek a diétás időtartam közepén. Ennek ellenére testtömegkülönbség a két csoport között nem volt, mindkét csoportunk folyamatosan gyarapodott. A koleszterinben gazdag diéta hatására már a második héten a kiindulási értékhez képest szignifikánsan magasabb szérumszén- és triglicerid-szintet mértünk. A koleszterindús tápot kapott csoportban a különbség a 8. hétig folyamatosan nőtt. A szérumban mért karbamid-, kreatinin-, glükóz- és inzulinszintekben a csoportok között a műtétet megelőzően nincs különbség. Az iszkémia-reperfúziót követően a normál tápon tartott csoportnál nem volt szignifikáns különbség a karbamid koncentrációban. Mind a négy csoportban a műtét beavatkozást emelkedett szérumszén-koncentráció kísérte. Az iszkémia-reperfúziót követően mind a normál, mind a koleszterindús tápon tartott állatokban jelentősen emelkedett a szérumszén- és inzulin-szint. Amennyiben az iszkémiát követően poszt kondicionálást alkalmaztunk, mindkét csoportnál az inzulin koncentrációban további fokozódás volt megfigyelhető. A normál tápon tartott csoportban a reperfúzió végére nőtt a szabadgyök-termelés, melyet a poszt kondicionálás szignifikánsan csökkentett. A koleszterindús tápot kapott csoportnál az iszkémia-reperfúzió nem járt fokozott szabadgyök-termeléssel. A műtét előtt a szérumszén-koncentráció minden csoportnál közel azonos volt. A normál tápon tartott állatokban a műtét beavatkozása jelentősen emelte a totál peroxid koncentrációt, ezt a poszt kondicionálás szignifikánsan csökkentette, míg a hiperkoleszterinémiás csoportnál változás nem történt. A normál/kontroll csoportban a műtét beavatkozást jelentős szérumszén-koncentráció-emelkedés kísérte, ezt a poszt kondicionálás szignifikáns mértékben csökkentette. A koleszterindús tápon tartott állatoknál nem emelkedett szignifikáns mértékben a TNF- α koncentráció a műtét hatására, a poszt kondicionált csoportban a reperfúzió végén szignifikánsan kisebb TNF- α koncentrációt mértünk a normál táp/ IR csoporthoz képest.

Morfológiai vizsgálatok eredményei: A vesében a papilla területén, a proximális tubulusnál láttunk morfológiai eltéréseket. Sejtes beszűrődést, fibrotikus elváltozást elsősorban észleltünk. A hyalincylinder megjelenése feltűnő volt a vese minden részében.

A HE és PAS metszeteken nem találtunk szignifikáns különbséget csoportjaink között. A proximális tubulus értékelésénél Jablonski 0-1-2 fázisokat láttunk, teljesen random módon.

A PAS-pozitív hyalincylinder mennyiségét a csatornák lumenében leszámolva nem láttunk csoportjaink és a lokalizáció tekintetében különbséget. A papilla területén megtartott volt a tubulushám. A kéregállomány interstíciumában kóros elváltozást egyik csoportban sem észleltünk. Feltételezzük, hogy a fázis, amikor eltávolítottuk a vesét, az iszkémia-reperfúzió időtartam rövidege miatt egy korai, egyéb fénymikroszkópos eltérésekkel járó fázis.

Immunhisztokémiai vizsgálat: A papilla és a corticomedulláris területen fénymikroszkópos immunhisztokémiával jelentős mértékű TNF- α pozitivitást láttunk a tubulusok hámjának citoplazmájában. Az arteriolák falában kiterjedt TNF- α pozitivitást észleltünk az IR károsodást szenvedett csoportjainknál. A papilla hámjában látható TNF- α mennyiségét számszerűsítettük és statisztikailag értékeltük. A normál tápot kapó csoportjaink közül a posztkondicionált csoportban szignifikánsan kisebb értéket detektáltunk, mint az IR csoportban. A normál csoporthoz képest a hiperkoleszterinemiás csoportban a papilla hámterületén nagyobb pozitivitást kaptunk. A koleszterindús táppal etetett csoportjainknál szignifikánsan magasabb értéket detektáltunk mindkét műtéti eljárásban, mint a normál tápot kapó csoportjainknál.

5. Megbeszélés

A posztkondicionálást Vinten-Johansen és munkatársai írták le elsőként, mint a szervezet egyik leghatásosabb védelmi reakcióját. Kísérletes körülmények között igazolták, hogy az iszkémiát követő reperfúzió során rövid idejű (10-20 s) iszkémiás- reperfúziós ciklusok hatására lényegesen mérséklődik a sejt- és szövetkárosodás. A kísérletek eredményei alapján a módszert klinikai körülmények között is alkalmazzák (szívműtétek, érsebészet). Ez az ígéretes endogén adaptáció az egészséges szervezetben kiválóan működik, azonban metabolikusan beteg egyéneknél a védelem nem, vagy csak részben váltható ki.

Kísérleteinkben ezért tűztük ki célul a hiperkoleszterinemiás állapot létrehozását, feltéve azt a kérdést, hogy vajon anyagcsere-rendellenességekben is jelent-e védelmet a reperfúziós károsodásokkal szemben az iszkémiás posztkondicionálás. Kérdésfelvetésünk aktualitását mutatja, hogy veseműtéteknél hosszabb iszkémia során, nem az akut rejeckció okozza a legnagyobb problémát, hanem az iszkémia-reperfúziós károsodás. Gyakran jár együtt az ateroszklerózis, hiperkoleszterinémia és lipidtárolási betegség vesebetegségekkel, és ezek a korai fázisban fokozhatják a vesekárosodást. A hiperkoleszterinémia növelheti a vesében az oxidatív stressz mértékét, endotél károsodásokat, gyulladást, fibrózist és szöveti károsodást okozhat.

Érdekesség, hogy az összes út aktiválása és a TNF- α indukálása is az endoplazmás retikulumba (ER) történő koleszterin áramlását igényli. A hiperkoleszterinémia mediálta ER-stressz az NF κ B és a MAPK gyulladásoz szignál útvonalak aktivációjához vezet. A TNF- α 3 útvonalat indukál: az apoptotikus sejthalált; a MAPK útvonal aktiválását; és NF κ B-útvonalat.

Célunk volt, hogy a citokin expressziót és az apoptózist vizsgáljuk a károsodott szövetekben a revaszkularizációt követően.

Tanulmányoztuk az iszkémiás posztkondicionálás protektív hatásait egészséges patkányokban az iszkémiás-reperfúziós károsodások kapcsán. Magas koleszterintartalmú táppal, hím patkányokban hiperkoleszterinemiát és hipertrigliceridemiát alakítottunk ki. Az általunk létrehozott állatmodell alkalmas volt arra, hogy indukált endogén védelem létrejöttét

anyagcsere-eltérésekben is megvizsgáljuk. Az iszkémia-reperfúziós károsodás mértékét a leukociták és az endotél által termelt TNF- α -szintekkel jellemeztük. Az iszkémia-reperfúziós károsodás egyik fő összetevője az oxidatív stressz, másik a steril gyulladás. Kísérleteinkben az oxidatív károsodás kimutatására szérumperoxid-szintet, illetve a teljes vérből az oxigén szabad gyökök koncentrációját határoztuk meg. A sejtaktiváció jellemzésére az aktivált sejtekben (leukocita, monocita, makrofág) termelődő és a szérumba kikerülő TNF- α mennyiségét mértük. Kísérleteink eredményei szerint egészséges, normál tápon tartott állatokon a posztkondicionálás szignifikánsan csökkentette az oxigén szabad gyökök mennyiségét és a peroxid koncentrációt, valamint a szérum-TNF- α -szintet. A hiperkoleszterinémias patkányoknál fellépő IR károsodások mértéke alacsonyabb volt a normál étrendű patkányokhoz képest, de a továbbiakban nem befolyásolta azokat a posztkondicionálás.

Ennek magyarázatára az a feltevésünk, hogy az általunk előidézett állapot, a hiperkoleszterinémia önmagában is képes volt indukálni az endogén védelmet, melynek következtében csökkent a reperfúzióval az oxidatív stressz súlyossága.

A szérumban mért karbamid, kreatinin, glükóz és inzulin szintekben a csoportok között a műtétet megelőzően nincs különbség. A műtéti beavatkozás mindkét csoportban jelentősen emelte a vércukor és inzulin szintet, mely a posztkondicionált csoportban még tovább fokozódott. Az irodalmi adatok szerint ez feltehetően a posztkondicionálás védelmi mechanizmusában szerepet játszik. A vesefunkció megítélésének elterjedten használt markere a szérumkreatinin-koncentráció. Mivel a kreatinin szinte csak glomeruláris filtrációval ürül a szervezetből (minimális mértékben szekretálódik még a tubulusokban) és a vesetubulusokban nem reabszorbeálódik, szintje arányos a felszabadulásának mértékével és a vese exkréciós működésével. Az állatok szérumkreatinin-koncentrációja mindkét operált csoportban szignifikánsan magasabb volt a műtét előtti értékhez képest. A posztkondicionált csoportban nem volt szignifikánsan kisebb a kreatininszint-emelkedés, mint az IR-kontroll csoportban. A szérumkarbamid-szintben nem találtunk szignifikáns különbséget. A koleszterindús tápot kapott állatoknál a karbamid szint a műtét hatására nem változik. Tehát a posztkondicionálás nem csökkentette a szérumkarbamid-szintet, a kreatinin szint alapján ugyanolyan mértékű veseelégtelenség jött létre minden csoportban, tehát a rövidtávú klinikai kimenetelt nem befolyásolta. Megállapíthatjuk, hogy szerencsés lett volna egy álműtött kontroll csoport használata is, hogy ezekben az állatokban milyen mértékű elváltozások történnek a műtét hatására. A HE, PAS metszeteken nem találtunk különbséget csoportjaink között, elképzelhető, hogy hosszabb iszkémiás és reperfúziós periódus után már látható lenne elváltozás. A vesénél az iszkémia-reperfúziós károsodás jeleit immunhisztokémiai módszerekkel analizáltuk. Főleg a reperfúziót követő gyulladási kaszkád fő faktorára, a TNF- α vizsgálatára helyeztük a hangsúlyt. Az iszkémia-reperfúzió során a komplex gyulladási kaszkád aktiválódik, melynek indukálásában és fenntartásában fontos szerepet játszanak a proinflammatorikus citokinek. Lokális gyulladást elősegítő hatásuk fokozottan érvényesül az iszkémia-reperfúzió során megjelenő mikrocirkulációs zavar hatására. A csökkent véráramlás miatt nem csak a védő faktorok, hanem a citokinek kimosódása is csökken a szövetből, így nagy koncentrációt érnek el a károsodott szövetben. A TNF- α az egyik legfontosabb proinflammatorikus citokin az IR károsodás patogenezisében. A TNF- α 25 kDa molekulatömegű 2-es típusú sejtmembrán fehérjeként szintetizálódik, amiből proteolitikusan

hasad le a 17 kDa méretű szekretált forma, amely stabil homotrimereket alkot. A TNF- α elsősorban aktivált makrofágokból, endotél sejtekből és a vesében parenchyma sejtekből származik. A TNF- α -t először tumorsejteket ölő és általános leromlást (kahexiát) okozó hatása alapján írták le (ez utóbbi miatt „kafektin”-nek is nevezték). A TNF- α nagyon erős kemotaktikus hatással rendelkezik, és fokozza a szabadgyök-termelést. Halálligand citokinnek is nevezik, mely specifikus receptoraihoz kapcsolódva elindítja az arra érzékeny sejtek apoptózis programját. Ilyenkor instruktív apoptózisról beszélünk. Kardiológiai kísérletekben leírták kardioprotektív hatását iszkémia-reperfúziós károsodás esetén. TNF- α receptor-asszociált faktor képes aktiválni az NF κ B transzkripciós faktort, mely számos gén promotéréhez képes kapcsolódni és antiapoptotikus lehetőségnek tekinthető. A TNF- α egyrészt direkt veseparenchyma károsodást idéz elő, másrészt erős kemotaktikus hatással rendelkezik. Az aktivált neutrofilek által termelt szabad gyökök a glomerulusok barrier funkcióját megszakítva megnövekedett albumin átérésztéshez vezetnek. Ezen kívül csökken a glomeruláris vérátáramlás és filtrációs ráta, a TNF- α stimulálja a mezangiális sejteket, különböző vazokonstriktor (trombocita aktivációs faktor, endothelin-1, proszttaglandinok) és vazodilatátor (adenozin, NO, proszttaglandinok) faktorok termelésére.

Eredményeink szerint a TNF- α mindkét csoportban a vese kéreg- és velőállományában egyaránt kimutatható volt, a legjellegzetesebb eltéréseket a papillában tapasztaltuk. A papilla hámjában látható TNF- α mennyiségét számszerűsítettük és statisztikailag értékeltük. A poszt-kondicionált csoportban szignifikánsan kisebb értéket detektáltunk, mint az IR csoportban. A koleszterinnel etetett állatoknál a poszt-kondicionálás nem változtatta meg a TNF- α mennyiségét.

Ennek alapján megállapíthatjuk, hogy az iszkémiás poszt-kondicionálás egészséges állatokon csökkentette a TNF- α pozitivitást- tehát az akut gyulladásos reakciót - míg a hiperkoleszterinémias állatokban ez nem jött létre.

Különösen fontosnak tartjuk azt a megfigyelésünket, hogy a hiperkoleszterinémia önmagában képes fokozni a TNF- α termelődést a vese tubulus hengerhám sejteiben és az erek simaizmában.

Wilson és munkatársai kimutatták: az NF κ B és a TNF- α nagy mennyiségben expresszálódik hiperkoleszterinémiában a vesében és fokozza a renális gyulladás mértékét. A neutrofil limfociták és makrofágok infiltrációja a különböző citokinek termelése által fokozhatja a szöveti károsodást. Korábbi tanulmányok már kimutatták, hogy a makrofágok és neutrofilek által termelt proinflammatorikus citokinek koncentrációja, emelkedett az iszkémiás vesében és pathofiziológiai szerepe lehet az IR sérüléseket követően.

Vizsgálatainkból levonható következtetésként kimondhatjuk, hogy a poszt-kondicionálás csökkentheti az egészséges szervekben a TNF- α -szintet, azonban a hiperkoleszterinémias szervek esetében ez a hatás nem alakul ki. Feltételezzük, hogy az NF κ B- és a MAPK-útvonalakat a hiperkoleszterinémia már a TNF- α receptor asszociált útvonal előtt indukálni képes. Így a korai válasz által lehetséges, hogy az iszkémia nem tud olyan szignifikáns gyulladásos választ kiváltani. Feltételezzük, hogy a hiperkoleszterinémia egy adott szintig befolyásolhatja az endogén védelmet. Hasonló eredményt kaptak Róth és munkatársai a szabad gyököket lekötő antioxidáns kezelés kapcsán, melynek során kiderült, hogy az endogén antioxidáns védelem aktiválásához szükséges bizonyos mennyiségű szabad gyök jelenléte. A hiperkoleszterinémia már önmagában is képes indukálni az endogén védelmet,

feltételezhetően egy a ROS-hoz kapcsolódó útvonal segítségével. Ez az útvonal akár jelentősebb szereppel bírhat a szérumban, mint magában a veseszövetben. Így megmagyarázható az eltérés a szérumban és a szövetben mért TNF- α -szintek között. Ezen feltevésünk bizonyítására még további kutatásokra van szükség.

IV. AZ ISZKÉMIÁS POSZTKONDITIONÁLÁS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA VESE ISZKÉMIA-REPERFÚZIÓT KÖVETŐEN 2-ES TÍPUSÚ DIABÉTESZ MELLITUSZBAN

1. Bevezetés

A **2-es típusú diabétesz mellitusz (T2DM)** multifaktoriális, poligenetikus betegség, melyet az inzulinszekréció elégtelensége, relatív inzulinhány és inzulinzisztencia jellemez. A zsírszövet is fontos regulátora az inzulin hatásának, mivel szabad zsírsavakat termel, melyek az inzulin receptor szubsztrát (IRS)-proteinek szerin-foszforilációjának elősegítése révén gátolják az inzulin jelátvitelét. Ezen kívül a zsírszövet endokrin szervként is funkcionál, adipokineket szekretál: az inzulin-antagonista hatású TNF- α -t, rezisztint, illetve az inzulin szenzitivitást növelő adiponektint és leptint. Inzulinzisztencia esetén, az inzulin célszervein (vázizom, szív, zsírszövet, hasnyálmirigy, máj) nem képes a fiziológiás hatását kifejteni, a pankreasz β -sejtjei fokozott inzulintermeléssel válaszolnak. A T2DM és az azt megelőző állapotok diagnózisát orális glükóz tolerancia teszt (OGTT) elvégzésével állíthatjuk fel. Ha az éhgyomri vércukorérték 5,6 és 6,9 mmol/l közötti, akkor emelkedett éhgyomri glükóz szintről (IFG) beszélünk. Ha a vizsgálat 2. órájában a kapott érték 7,8-11,0 mmol/l közötti, akkor károsodott glükóz toleranciát (IGT) állapíthatunk meg. 2-es típusú diabétesz mellituszról (T2DM) beszélünk, ha a random (nem éhgyomri) vércukor > 11,1 mmol/l, ha az éhgyomri vércukorérték > 7 mmol/l, vagy ha az orális glükóz tolerancia teszt során a 2 órás érték a 11,1 mmol/l-t meghaladja.

2. Célkitűzések

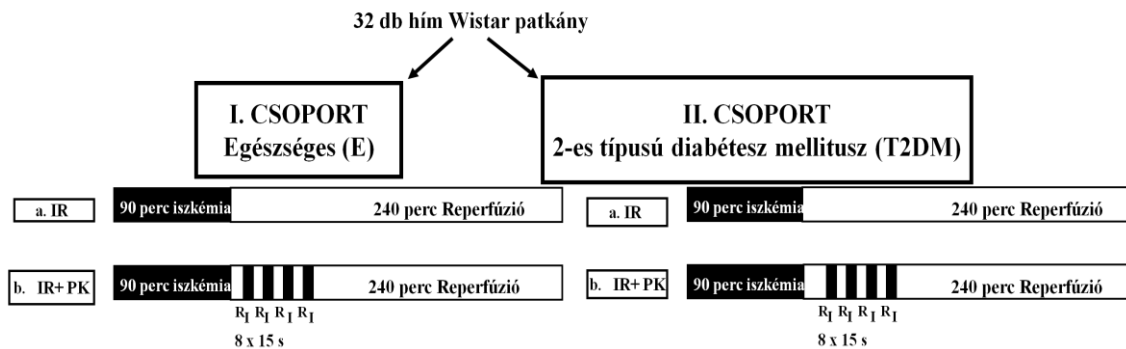
Munkánk második részében célkitűzésünk: 2-es típusú diabétesz mellituszban (T2DM) veseilus-okklúziót követően iszkémiás posztkondicionálás alkalmazása; és a kialakuló oxidatív stressz és gyulladáshoz kapcsolódó válaszreakciók mértékének vizsgálata. Kérdésünk, hogy normál és T2DM patkányokban az orális glükóz tolerancia teszt során milyen mértékben változik a szérumglükóz-, inzulin- és TNF- α -szint.

Célunk az iszkémiás posztkondicionálás hatásának vizsgálata vesében 90 perc iszkémiát és 240 perc reperfúziót követően; az iszkémiás posztkondicionált csoportban a reperfúzió kezdeti fázisában 4 ciklus 15 másodperces reperfúziót és 15 másodperces reokklúziót alkalmaztunk. Ezt követően vérben, szérumban és távoli szervben (a májban) a kialakuló oxidatív stressz és gyulladáshoz kapcsolódó válaszreakciók vizsgálata. Az oxidatív stressz mértékét a

szérumperoxid-szint mérésével kívántuk jellemezni. A reperfüzió indukálta gyulladáshoz való válaszként a TNF- α meghatározásával, és a fehérvérsejtek indukált szabadgyök-termelésével. Továbbá mértük az antioxidáns enzimek (SOD, GSH) mennyiségét, aktivitását, és a lipidperoxidáció indirekt markereként ismert malondialdehid koncentrációját májszövetben.

3. Anyag és módszerek

Kísérletünkhöz 32 darab ivarérett, hím, 3 hónapos Wistar patkányt használtunk. Az állatokat egyesével, külön ketrecekbe helyeztük el, melyeket egyedi azonosító számmal láttunk el. A patkányokat két csoportra osztottuk. Az egyik csoportot normál patkánytáppal [E], a másikat egy zsírdús, általunk készített táppal etettük [T2DM]. A száraz laboratóriumi patkánytápot őrlemény formájában szereztük be. Ehhez koleszterint, epesavat és napraforgóolajat kevertünk, úgy hogy a táp 2% koleszterin, 0,5% kólsav és 20% napraforgóolaj tartalmú legyen.



A kísérlet 5. és 12. hetét követően kezdtük meg a műtéteket. A narkózt intraperitoneálisan bólusban adott ketamin: diazepam (Seduxen, Richter G. Rt., Magyarország) 1:1 arányú keverékével végeztük (0,2 ml / 100 tsg). Laparotómiát követően mobilizáltuk a mezenterialis gyököt, majd mindkét vesét atraumatikus mikroklippel 90 percre a keringésből kirekesztettük. Mindkét csoportot további alcsoportokra osztottuk (n=4): az egyik alcsoportnál iszkémiát követően 4 órás reperfüziót [IR], a másik alcsoportnál pedig az iszkémiát követően a reperfüzió megkezdése előtt 2 perc posztkondicionálást (15 s reperfüzió / 15 s reokklúzió 4 ciklusban) alkalmaztunk [PK]. A kétórás reperfüziót követően vért és szövetmintákat vettünk. Az állatokat exsanguináltuk, vért és szérumot használtunk a következőkben részletezésre kerülő paraméterek mérésére. Szövetteni vizsgálatra a májat (V. lebeny) a feldolgozásig -70 °C-on folyékony nitrogénben tároltuk.

Laboratóriumi vizsgálatok:

Glükóz, koleszterin, triglicerid, szabadgyök-termelés, TNF- α citokin meghatározása

A már ismertetett módszer szerint végeztük a vizsgálatokat (5. oldal).

Orális glükóz tolerancia teszt (OGTT)

A koleszterin- és szénhidrát anyagcserére gyakorolt hatásának jellemzésére a diéta beállítását követő 5. és 12. héten cukorterhelést végeztünk. Az állatokat a kísérlet előtti nap

délutánjától éhezettük (15 óra tápmegvonás). A kísérlet napján meghatároztuk az éhgyomri vércukorszintet. Majd orálisan gyomorszondán keresztül 1 g/kg glükózt adtunk és az ezt követő 5., 15., 30., 60. és 120. percen meghatároztuk a vércukorszintet. Az inzulin és TNF- α koncentrációját a tolerancia teszt 0., 30., 60. és 120. percében mértük meg.

Inzulin meghatározása

Inzulin „high range” ELISA- kit (ALPCO Diagnostics, Salem, USA) segítségével, a kitben szereplő útmutató alapján kvantitatívan mértük kísérleti állataink széruminzulin-szintjét.

Inzulinrezisztencia meghatározása (HOMA_{IR})

A HOMA_{IR} index a szervezet inzulinérzékenységének meghatározására szolgáló módszer. A HOMA_{IR} indexet az éhgyomri vércukor- és inzulinszintből az alábbi képlet alapján számoltuk: $HOMA_{IR} = \frac{[Éhgyomri\ inzulin\ (\mu U/ml) \times glükóz\ (mmol/l)]}{22,5}$. Minél alacsonyabb ez az érték, az inzulinérzékenység annál jobb. ≤ 1 normális; > 2 inzulinrezisztencia gyanúja; $> 2,5$ inzulinrezisztencia valószínű; $> 4,4$ T2DM.

Matkovics-féle malondialdehid (MDA) meghatározás májszövetből

Minta előkészítése: thiobarbiturát (TBA, Renal) 10%-os perklórsavban (Reanal) készített túltelített oldatát háromszoros mennyiségű 20 %-os triklórecetsavval (TCA, Carbo Erbe) elegyítettük. Az így kapott 1:3 arányú elegy 4,5 ml-éhez 0,5 ml homogenizátum (1 g szövet+ 4 ml 0,9 % fiziológiás só) adunk. A keletkezett mintát forrásban levő vízfürdőben 20 percig inkubáltuk, majd jégben gyorsan hűtöttük és 4000 rpm-en 15 percig centrifugáltuk (Universal 3RF, Hetterich Zentrifugen). A felülúszót 532 nm-en, a TBA-TCA elegy ellenében fotometrálunk (Milton Roy Spectronic 6001 spektrofotométer). A minták koncentrációját (nmol/ml) standardgörbe alapján határoztuk meg.

Szuperoxid dizmutáz enzim aktivitás mérése májszövetben

Minta előkészítése: 1 gramm májszövethez 4ml hideg fiziológiás sót adunk. Homogenizálás után hűtött gyorscentrifugában centrifugálunk 20 percig 16000-es fordulattal (Hettich Zentrifugen Universal 3RF) 4°C-on. A felülúszót leöntjük, és ezt különböző hígításokból mérjük. Az üledékből 100-szoros hígítást készítettünk fiziológiás sóoldattal. *Mérés:* Hitachi U-2001 típusú spektrofotométer. *Adrenalin standard (ASTD):* 1,6488 mg/ml adrenalin 0,1N sósavban oldva. *0,05 M- os SOD puffer:* 3597 g Na₂CO₃, 1428 g NaHCO₃ 1000 ml deszt.vízre, 0,037 g EDTA. 100 μ l hígított szövet, melyhez 100 μ l-t adunk az ASTD-ből. A végső térfogat mindig 3 ml. *Aktivitätsmérés:* Az abszorbanciát 480 nm-en 3 percig folyamatosan mértük és regisztráltuk. A kontroll görbe és a minta jelenlétében kapott görbe felszálló szárainak meredeksége közötti eltérésből számítottuk ki a gátlás mértékét.

Redukált glutation (GSH) meghatározás májszövetből

Minta előkészítése: 1 gramm májszövethez 4 ml fiziológiás sóoldatot adtunk, majd homogenizáltuk. 1 ml homogenizátumhoz 10%-os triklórecetsavat (TCA, Carbo Erbe) adtunk. Az elegyet 15 percig 4000-es fordulattal centrifugáltuk. A felülúszó 2 ml-éhez 4 ml 0,4 M-os (pH 8,7) Trisz-(hidroximetil)-amino-metan (TRIS, Reanal) puffert adtunk. Az így

kapott elegyet 100 µl 5,5-Dithiobisz-2-nitrobenzoesav (DTNB, SERVA) hozzáadása után, 412 nm-en fotometráltuk (Milton Roy Spectronic 6001). A minta GSH koncentrációját (nmol/ml) standardgörbe alapján határoztuk meg.

4. Eredmények

A két kísérleti periódusban egyik kísérleti csoportnak sem gyarapodott jelentősen a testsúlya. Mindkét csoport elfogadta a kínált tápot. Eleinte a koleszterinnel etetett állatok szignifikánsan többet fogyasztottak, mint a kontroll csoport, de a 3. hét kezdetétől a két csoport tápfogyasztása nem különbözött. A zsírdús tápon tartott kísérleti állatok szérumkoleszterin- és triglicerid-szintje szignifikánsan magasabb volt a normál diétán tartott állatokhoz képest mind az ötödik, mind a tizenkettedik héten. A zsírdús táppal etetett csoportban az éhgyomri vércukorszint a 12. héten szignifikánsan nagyobb volt, mint a normál tápon tartott csoporté. Az éhgyomri széruminzulin-szintben nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget.

Az 5. héten az éhgyomri vércukor szint a fiziológiásnak megfelelő volt mindkét csoportnál. A szérumglükóz-emelkedés a zsírdús táppal etetett csoportban azonnal jelentkezett, míg a kontroll csoportnál több idő telt el, míg a szérumglükóz-szint emelkedése megindult. A vércukor emelkedés maximuma szignifikánsan magasabb volt a zsírdús tápon tartott állatoknál a 30. percben, de 2 óra múlva mindkét csoport vércukor szintje normalizálódott, nem különbözött szignifikánsan az éhgyomri szinttől. A vizsgálat során a zsírdús táppal etetett csoportban a 15., 30., 60. percben a szérumglükóz-szint magasabb volt, mint 11,1 mmol/l, a 120. percben normalizálódott. A 12. héten a zsírdús táppal etetett csoport éhgyomri értéke $5,37 \pm 0,53$ mmol/l volt. A kontroll csoportban a vizsgálat 2. órájában $9,032 \pm 0,337$ mmol/l a szérumglükóz-szintje, mely károsodott glükóz toleranciára utal (IGT). A zsírdús tápon tartott csoportban az OGTT 60. percében szignifikáns különbséget mértünk a kontroll csoporthoz képest. Az érték nagyobb, mint 11,1 mmol/l, vagyis az eltérés T2DM-nek felel meg.

Éhgyomri inzulin szintben szignifikáns különbség a két csoport között nem volt. A széruminzulin-szint a kontroll csoportban a glükóz beadása utáni 30. percben érte el maximális értékét, mely szignifikánsan több volt, mint a zsírdús táppal etetett csoportban mért érték. A zsírdús táppal táplált csoportban nem tapasztaltunk inzulinkoncentráció növekedést a per os 1 g/kg glükóz beadása utáni 120 percben. Méréseink szerint mindkét csoportban inzulinrezisztencia alakult ki, azzal a különbséggel, hogy míg a zsírdús táppal etetett csoportnál egyáltalán nem tapasztaltunk az exogén glükóz által indukált inzulin felszabadulást, addig a kontroll csoportban kismértékben indukálható volt az inzulinszekréció.

A szérum-TNF- α -koncentrációban az 5. hét során nem volt szignifikáns különbség csoportjaink között. A 12. hét után a TNF- α koncentrációja szignifikánsan magasabb a zsírdús táppal etetett csoportban a normál csoportéhoz, valamint az 5. héthez képest. Meglepő módon mindkét csoportban az 1g/kg p.o. adott cukor hatására átmenetileg megemelkedett a szérum-TNF- α -szint, maximális koncentrációját a 30. percben mértük (szinkronban az inzulinemelkedéssel), majd a 120. percben visszatért a kiindulási értékre.

A kontroll-IR csoportban minimálisan megemelkedett, míg a posztkondicionált állatoknál a műtét előtti szinttel megegyezett a műtét után mért vércukor szint. A zsírdús táppal etetett állatokban a posztkondicionálás hatására szignifikánsan emelkedett a szérumglükóz-koncentráció. Az inzulinszint mind az IR, mind a posztkondicionált állatoknál megemelkedett a műtét hatására, de szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk. A műtéti beavatkozás emelte a TNF- α -koncentrációt minden csoportnál, szignifikáns növekedést egyedül a normál tápon tartott, posztkondicionált állatoknál mértünk. A PMA indukálta szabadgyök-termelés a normál tápon tartott csoportban kisebb volt a T2DM csoporthoz képest. Kisebb, de nem szignifikáns értéket mértünk a normál tápon tartott, posztkondicionált csoportban az iszkémia-reperfúziós csoporthoz képest. T2DM-ben növekedett a szabadgyök-produkció, nem szignifikáns mértékben.

Az 5. héten a posztkondicionálás a kontroll csoportban szignifikánsan csökkentette a membránkárosodást, mert a lipidperoxidációt jelző malondialdehid májban mért szintje szignifikánsan kisebb volt az I/a. csoporthoz képest. A II/b. csoportban a posztkondicionálást követően nem változott az MDA koncentráció az iszkémia-reperfúziós csoporthoz képest (II/a.). A 12. héten a normál tápon tartott csoportban a posztkondicionálás csökkentette az MDA koncentrációt. A T2DM, posztkondicionált csoportban (II/b.) szignifikánsan több MDA-t mértünk, mint az IR csoportban és az 5. héten.

A szuperoxid dizmutáz enzim aktivációja az 5. héten emelkedett a posztkondicionált csoportban. A T2DM posztkondicionált csoportban kisebb a SOD aktivációja, mint a normál táppal etetett iszkémia-reperfúziós, valamint a posztkondicionált csoportban. A 12. héten a posztkondicionált csoportban szignifikánsan kisebb a SOD aktivációja az egészséges állatokban az 5. héthez képest. A T2DM posztkondicionált csoportban szignifikánsan több SOD enzim aktivációt mértünk, mint az IR csoportban.

Az 5. héten a reperfüzió végén a posztkondicionált csoportban szignifikánsan kevesebb a GSH koncentrációja. A koleszterin, epesav és napraforgóolajban dús tápon tartott csoportban, tehát T2DM-ben szignifikánsan kisebb a GSH koncentrációja, mint a normál táppal etetett csoportban. A 12. hét elteltével szignifikánsan kisebb a normál tápon tartott csoport GSH koncentrációja.

5. Megbeszélés

Ivarérett, hím, 3 hónapos Wistar patkányokat 2% koleszterin, 0,5% epesav és 20% napraforgóolaj tartalmú táppal 5 és 12 hétig speciális diétán tartottunk. A diéta bevezetését követő 5. és 12. héten orális cukorterhelést végeztünk 1g/kg glükóz per os adásával. A normál tápon tartott csoportnál patkányokban az 5. heti fizioiogiás cukorterhelési görbét a 12. héten károsodott glükóz tolerancia és inzulinrezisztencia váltotta fel, mely csaknem összemérhető volt zsírdús tápon tartott csoportéval. Ezt azzal magyarázzuk, hogy Escriva és munkatársai kimutatták, hogy a korábban metabolikusan egészséges Wistar patkányokban az öregedés során perifériás inzulinrezisztencia jön létre.

A 12. hét után a TNF- α koncentrációja szignifikánsan magasabb T2DM-ben, ez megegyezik a korábbi irodalmi mérésekkel. Mindkét csoportban az exogén glükóz hatására átmenetileg, az inzulinnal párhuzamosan megemelkedett a szérum-TNF- α -szint is, melynek maximális koncentrációját a 30. percben mértük, a 120. percre pedig visszatért a kiindulási

értékére. A metabolikus állapot jellemzésére HOMA inzulinrezisztencia indexet számoltunk, ahol eredményeink alapján az inzulinrezisztencia valószínűsíthető, de T2DM nem mondható ki. A zsírdús táppal etetett csoport esetében 2-es típusú diabétesz mellitusz (T2DM) volt megfigyelhető. Ezen kísérleti állataink inzulintermelése nem volt indukálható az OGTT során sem az 5., sem a 12. héten.

Az így létrehozott állatmodell alkalmas volt arra, hogy az endogén védelem létrejöttét T2DM-ben vizsgáljuk. Kísérletünk 5. és 12. hetében műtéteket végeztünk. Mind a zsírdús (T2DM), mind a normál táppal etetett (Egészséges) kísérleti csoportunkat két további alcsoportra osztottuk. Az egyik alcsoporton 90 perces iszkémiát indukáltunk mindkét oldali vese ereinek leszorításával, majd négy órán keresztül reperfúziót végeztünk. A másik alcsoporton 2 perces iszkémiás posztkondicionálást hajtottunk végre a 240 perces reperfúzió megkezdése előtt. A műtétek előtt és után kísérleti állatainktól vért vettünk, melyből glükóz, inzulin, szabad gyök, karbamid, kreatinin és TNF- α koncentrációkat határoztunk meg. A négyórás reperfúziót követően szövetmintát (máj) vettünk.

A műtétet követően a szérum-TNF- α -szint a normál, posztkondicionált csoportban nem csökkent. A TNF- α volt az első olyan zsírszöveti citokin, amelynek felismerték szerepét az elhízás és az inzulinrezisztencia kapcsolatában. Az irodalom a TNF- α inzulinrezisztenciában játszott szerepével számos cikk foglalkozik, melyekben különböző eredmények születtek. Day és munkatársai a -238 A allélt hordozók körében alacsonyabb inzulinrezisztencia paramétereket talált, míg a -308 A allél hordozása nem mutatott összefüggést az inzulinérzékenységgel. Más vizsgálatokban a -308 A allél hordozása az elhízás és az inzulinrezisztencia magasabb rizikójával járt. A TNF szerepét vizsgálták TNF- illetve TNFR-gén hiányos egerekben. A TNF hiánya a táplálkozás eredetű elhízásban és az ob/ob genotípusú egerekben egyaránt az inzulinszenzitivitás határozott javulását eredményezi. Ez jelzi, hogy elhízás kapcsán a TNF az inzulinrezisztencia egy fontos mediátora, mivel az inzulin mediálta folyamatokat különböző pontokon befolyásolja.

A TNF- α három ponton avatkozik be az inzulin jelátvitelébe. A TNF- α elősegíti az IRS-1 szerin foszforilációját, amely akadályozza az inzulin által stimulált tirozin foszforilációt, így károsodik a PI3K-út. Aktiválja az SH-PTPáz, mely eltávolítja a tirozin foszfát csoportokat az IRS-1 fehérjéről, ezzel terminálva az inzulinhatást. Végül pedig foszforilációja révén inaktiválja a protein foszfát-1-et, ezáltal csökkentve a glükóz raktározását. Fontos szerepe van a 2-es típusú diabétesz mellitusz pathogenezisében. A jelenség hátterében az áll, hogy a TNF- α interferál az inzulin egyik jelátviteli mechanizmusával, olyan módon, hogy gátolja az inzulinreceptor tirozin-kináz aktivitását és az inzulin receptor szubsztrát-1 foszforilációját. Így az inzulin nem tudja indukálni a tirozin kötőhelyen történő foszforilációt, ami feltétlenül szükséges lenne az inzulin jelátviteléhez. Az előbbiekből következően az inzulin szenzitív szövetekben a glükóz transzporter nem jut fel a sejtek felszínére és perifériás inzulinrezisztencia jön létre.

Fontosnak tartjuk azt a megfigyelésünket, hogy a glükóz terhelés során nem csak inzulin felszabadulás figyelhető meg, hanem ezzel párhuzamosan a szérum-TNF- α -szint is megnő. Az állandóan magas vércukorszint együtt járhat a gyulladással, a citokinek fokozott termelésével, és ez szerepet játszhat az inzulinrezisztencia kialakulásában patkánymodellben is.

Vizsgáltuk, hogy a májban, a reperfüzió közvetlenül nem érintett szövetében milyen jelentősége van az iszkémiás posztkondicionálásnak iszkémiás-reperfüziós károsodásban. Az oxidatív folyamatok védő oldalaként ismert endogén antioxidáns scavenger anyagok közül a glutation (GSH) koncentrációját és a szuperoxid dizmutáz (SOD) aktivitását mértük májszövetben. Ismert, hogy protektív hatással rendelkezik a reperfüziós károsodásokban a glutamin, katabolikus állapotokban esszenciális aminosavként viselkedik. A glutamin védő hatása a csökkent szabadgyök-produkción keresztül valósul meg; ismerve a tényt, hogy a glutamin a májban, az antioxidáns glutation (GSH) bioszintézisében vesz részt, illetve prekursor molekulája. Ugyanakkor a glutamin, a fentiek mellett az apoptózisban is fontos szerepet tölt be. Feltételezések szerint a glutamin a Fas ligandmediált apoptózist gátolja, a TNF- α mediált apoptózist serkenti.

Kísérletünkben a SOD és GSH koncentrációja szignifikánsan csökkent T2DM-ben, jelezve a fokozott gyöktermelésből származó felhasználódásukat.

Elterjedt az a nézet, hogy számos kardiovaszkuláris rizikótenyező, mint például az oxidatív stresszt okozó cukorbetegség, az elhízás az endotél diszfunkcióját okozza. Patológias metabolikus állapotokban a szabadgyök-képződés is jelentősen megnő. Számos tény igazolta, hogy az emelkedett szabadgyök-koncentráció önmagában is felelőssé tehető az endotél diszfunkcióért, mivel a szuperoxid szabad gyökök az endotélhez közvetlenül kapcsolódva, direkt módon képesek azt károsítani. Az ereket az egy sejtsor vastagságú vaszkuláris endotél béleli, amely érzékenyen reagál a hemodinamikai változásokra. Feladata a vaszkuláris tónus és struktúra fenntartása, a vaszkuláris sejtek növekedésének, a thrombotikus és a fibrinolitikus folyamatoknak, a gyulladásos és immunfolyamatoknak, a fehérvérsejtek adhéziójának, a vaszkuláris permeabilitásnak, az oxidációs-redukciós folyamatoknak a szabályozása, a lipidoxidáció befolyásolása.

Mind a lipidperoxidáció indirekt markereként ismert malondialdehid koncentrációja májszövetben, mind a fehérvérsejtek indukált szabadgyök-termelése sérumban szignifikánsan emelkedett volt T2DM-es csoportban az egészséges kontroll csoporthoz viszonyítva. A posztkondicionálás jótékony hatását 90 perc iszkémiát követően csak a máj MDA koncentrációjában tudtuk igazolni. Kísérletünkben láthatjuk, hogy célzott vese iszkémia-reperfüzió során megváltozik a máj antioxidáns rendszer aktivitása, melyre pozitív hatással van a posztkondicionálás.

V. AZ ISZKÉMIÁS ÉS FARMAKOLÓGIAI POSZTKONDITIONÁLÁS HATÁSA A VESE ISZKÉMIA-REPERFÚZIÓS KÁROSODÁSÁIRA STREPTOZOTOCIN-INDUKÁLT DIABÉTESZ MELLITUSZBAN

1. Bevezetés

Vinten-Johansen és munkatársai 2005-ben kijelentették, hogy nagy előrelépést jelentene, ha sikerülne találni egy védő farmakológiai állapotot, mely imitálja a posztkondicionálást. Számos farmakoterápiás próbálkozásról olvashatunk az irodalomban, ahol különböző anyagokkal kísérelték meg befolyásolni a reperfüzió eseményeit. A legtöbb

ilyen kísérlet miokardium iszkémia-reperfúziós károsodása kapcsán történt. Ilyenek voltak az adеноzin és analógjai, a nitrogén-monoxid, az inzulin, opioidok, CO₂ és sok más anyag. Eddig egy szert sem vezettek még be a rutin klinikai gyakorlatba. Még nem bizonyított, hogy a farmakológiai szerek intermittáló adagolása imitálni tudja-e a poszt kondicionálás időbeli karakterisztikáját, és így hatékonyabb-e alkalmazásuk.

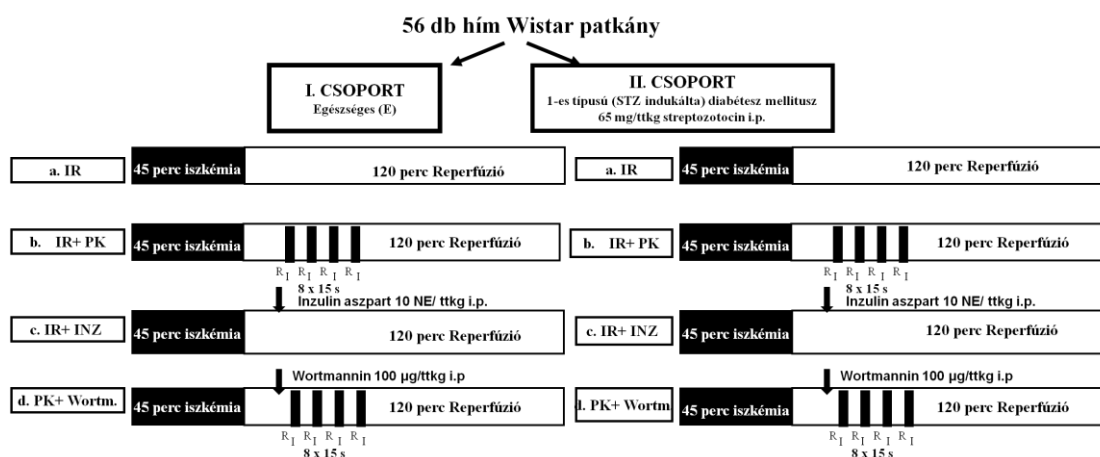
2. Célkitűzések

Harmadik kísérletsorozatunkban 1-es típusú diabéteszes állatmodellen kívánjuk vizsgálni az iszkémiás és farmakológiai poszt kondicionálást. Az inzulinról kimutatták kardioprotektív hatását akut koronária iszkémia során. Nem történtek még széleskörű vizsgálatok az inzulin vese iszkémia-reperfúziós károsodása tekintetében. Az inzulin hatására aktiválódik az Akt enzim, mely a sejtek metabolizmusában, cukorfelvételében, raktározásában és a sejt túlélésében játszik szerepet. A poszt kondicionálás által aktivált útvonalak a molekuláris magyarázat szerint; a PI3K, az Akt, a MEK, az ERK túlélést segítő jelátviteli utak aktiválása (RISK), és az antiapoptotikus enzimek termelődése vezet az iszkémiás károsodás kivédéséhez. A PI3kináz gátlószere, a Wortmannin korábbi kísérletekben megsemmisíti a poszt kondicionálás infarktus-csökkentő potenciálját. Ezen útvonal gátlásával célunk az iszkémiás poszt kondicionálás közelebbi, mélyebb megismerése vese iszkémia-reperfúzió esetén.

Ebben a kísérletsorozatban célunk az iszkémiás poszt kondicionálás hatását vizsgálni 45 perc vese iszkémiát és 120 perc reperfúziót követően. Az iszkémiás poszt kondicionált csoportban a reperfúzió kezdeti fázisában 4 ciklus 15 másodperces reperfúziót és 15 másodperces reokklúziót alkalmaztunk. Az iszkémia-reperfúziós károsodás vizsgálata szérumban és perifériás szövetekben, a TNF- α citokin szint meghatározásával történt. Az iszkémiás-reperfúziós károsodás mértékét veseszövetben HE és TNF- α immunhisztokémiai fénymikroszkópos módszerrel vizsgáltuk.

3. Anyag és módszerek

Vizsgálatainkat 56 darab hím Wistar patkányon (testtömeg: 300 \pm 50 g) végeztük. Kísérletünkben az 1-es típusú diabétesz indukálására a streptozotocint (STZ: 65 mg/kg ip, Sigma Chemical Co., Budapest) 0,1M citrát pufferben (pH 4,5) oldottuk fel, intraperitoneál injektáltuk. A kontroll csoportnak bőr alá fiziológiás só (65 mg/kg) injektáltunk. A vércukrot farokvégből nyert vérből, Accu Chek Active (Roche, Magyarország) vércukorszintmérő készülékkel rendszeresen mértük. 5-7 nap elteltével azokat az állatokat választottuk be a kísérleti diabéteszes csoportba, amelyeknél a vércukor koncentráció értéke megegyezett vagy meghaladta a 17 mmol/l értéket.



Az altatást intraperitoneálisan adagolt Calypsol és Seduxen 1:1 arányú keverékével végeztük (0,2 ml/ 100 tsg). Az állatot hátára fektetve, lábait leragasztva rögzítettük a műtőpadon. Laparotómiát követően mobilizáltuk a mezenteriális gyököt, meggyőződünk a vesék kb. azonos nagyságáról, illetve azonosítottuk az ellátó ereket, majd mindkét vesét atraumatikus mikroklippel 45 percre a keringésből kirekesztettük. A patkányokat az alábbi csoportokba (n=7) osztottuk. Mintavételre a reperfúzió végén került sor. A kétórás reperfúziót követően az állatokat exsanguináltuk, vért és szérumot használtunk a következőkben részletezésre kerülő paraméterek mérésére. Szövetetani vizsgálatra a bal vesét formalinba helyeztük.

Laboratóriumi vizsgálatok

Glükóz, koleszterin, triglicerid, szabadgyök-termelés, TNF- α citokin meghatározása

A már ismertetett módszer szerint végeztük a vizsgálatokat (5. oldal).

Morfológiai vizsgálatok

A bal oldali vesét a reperfúziót követően 10%-os neutrális formalinban fixáltuk, majd felszálló alkoholsorban víztelenítettük és paraffinba ágyaztuk. A vese keresztmetszete mentén készült 5 μ m vékony metszetek egy részét haematoxilín-eosinnal (HE) festettük meg. Vizsgáltuk csoportonként a vese minden rétegét, és a hyalincylinder mennyiségét. A tubulusok értékelésére a Jablonski score-t, és a Banff szerinti beosztást használtuk. Immunhisztokémiai vizsgálataink TNF- α monoklonális eger ellenanyaggal történtek, mely keresztreakciót ad más rágcésálók, így a patkány TNF- α -val is. A monoklonális ellenanyag a TNF- α -t termelő sejtek citoplazmáját festi. A folyamat laboratóriumi és kiértékelési tematikája a 6. oldalon található.

4. Eredmények

Laboratóriumi vizsgálatok eredményei: A streptozotocinnal indukált diabétesz mellituszban az éhgyomri vércukor szignifikánsan nagyobb, mint a normál tápon tartott csoportban. Az STZ diabéteszben szignifikánsan kisebb a szérum-TNF- α -szintje a kontroll csoporthoz képest. A szérumkreatinin-szintben a csoportok között a műtétet megelőzően

nincs különbség. Mind a négy csoportban a műtéti beavatkozást követően emelkedett a kreatinin koncentrációja méréseink szerint. Kisebb a szérumbkreatinin-koncentrációja a kontroll posztkondicionált és az inzulinnal posztkondicionált csoportban az IR csoporthoz képest. A Wortmanninnal gátolt, iszkémiás posztkondicionált csoportban magasabb a kreatinin koncentrációja az I/b. és I/c. csoporthoz képest. STZ diabétesz mellituszban magasabb a szérumbkreatinin-koncentrációja műtétet megelőzően az egészséges csoportokhoz képest. Szignifikánsan magasabb a kreatinin koncentráció STZ indukálta diabétesz mellituszban az iszkémiás posztkondicionált, Wortmanninnal kezelt csoportban. Az iszkémiás posztkondicionálás csökkentette a TNF- α koncentrációt az egészséges kontroll IR csoporthoz képest. A 45 perces iszkémiát követően inzulinnal kezelt csoportban és a Wortmanninnal gátolt iszkémiás posztkondicionált csoportban szignifikánsan emelkedett a koncentráció a reperfüzió végén. STZ indukálta diabétesz mellituszban az iszkémiás posztkondicionálás nem csökkentette szignifikánsan a TNF- α koncentrációt az IR csoporthoz képest. A Wortmanninnal gátolt iszkémiás posztkondicionált csoportban szignifikánsan emelkedett a koncentráció a reperfüzió végén.

Morfológiai vizsgálatok eredményei: A HE metszeteken az egészséges, kontroll csoportban nem találtunk különbséget csoportjaink között. Jablonksi 0-2 és Banff Grad I. fázisokat láttunk. Szignifikáns különbséget láttunk a STZ diabéteszes IR csoportban származó metszetekben, ahol Grade II súlyosságú multifokális tubuláris atrófiát tapasztaltunk a corticomedulláris átmenetben. A papilla hámjában látható TNF- α mennyiségét számszerűsítettük és statisztikailag értékeltük. A normál tápot kapó csoportjaink közül a posztkondicionált csoportban szignifikánsan kisebb értéket detektáltunk, mint az iszkémia-reperfüziós csoportban. Az inzulinnal posztkondicionált csoportban szignifikánsan magasabb volt a TNF- α koncentrációja, mint az iszkémiás posztkondicionált csoportban. STZ indukálta diabétesz mellituszban magasabb értékeket detektáltunk minden csoportban, mint a kontroll csoportban. A csoportokon belül szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk.

5. Megbeszélés

Tanulmányoztuk az iszkémiás és farmakológiai posztkondicionálás protektív hatásait egészséges és STZ indukálta diabétesz mellituszban.

A szérumbkreatinin-szintben a csoportok között a műtétet megelőzően nincs különbség. A Wortmanninnal gátolt, iszkémiás posztkondicionált csoportban magasabb a kreatinin koncentrációja a többi csoporthoz képest. Szignifikánsan magasabb a kreatinin koncentráció STZ diabétesz mellituszban az iszkémiás posztkondicionált, Wortmanninnal kezelt csoportban az inzulinnal kezelt csoporthoz képest. A TNF- α jelentős citokin az IR károsodásban. Az iszkémia-reperfüziós károsodás mértékét a leukociták és az endothelium által termelt TNF- α szintekkel jellemeztük. Kísérleteink eredményei szerint egészséges, normál tápon tartott állatokon a posztkondicionálás szignifikánsan csökkentette a szérumbkreatinin-szintet. A 45 perces iszkémiát követően inzulinnal kezelt csoportban és a Wortmanninnal gátolt iszkémiás posztkondicionált csoportban szignifikánsan emelkedett a koncentráció a reperfüzió végén. STZ indukálta diabétesz mellituszban fellépő iszkémia-reperfüziós károsodások mértéke magasabb volt a kontroll csoporthoz képest, de nem

befolyásolta azokat az iszkémiás posztkondicionálás, mint ahogy az inzulin alkalmazása a reperfüzió kezdetén sem. Az inzulinnal történő farmakológiai posztkondicionálás nem csökkentette a szérum-TNF- α -szintet egyik csoportban sem.

A HE metszeteken az egészséges, kontroll csoportban nem találtunk különbséget csoportjaink között. Jablonksi 0-2 és Banff Grad I. fázisokat láttunk. Feltételezzük, hogy 2 óra reperfüziós időtartam rövid, még fénymikroszkópos eltérés (HE) nélküli fázis.

Szignifikáns különbséget láttunk az STZ diabéteszes IR csoportban származó metszetekben, ahol Grade II súlyosságú multifokális tubuláris atrófiát tapasztaltunk a corticomedulláris átmenetben. Mint ahogy már az első fejezetben tapasztaltuk, kísérletünket megismételve szintén megállapítható, a TNF- α mindkét csoportban a vese kéreg- és velőállományában egyaránt kimutatható volt. A papilla hámjában látható TNF- α mennyiségét számszerűsítettük és statisztikailag értékeltük. A posztkondicionált csoportban szignifikánsan kisebb értéket detektáltunk, mint az IR csoportban. STZ indukálta diabétesz mellitusban a posztkondicionálás nem változtatta meg a TNF- α mennyiségét.

VI. KÖVETKEZTETÉSEK

A szervátültetés sikerének egyik fontos pillére az iszkémia-reperfüzió okozta károsodás megelőzése, illetve kezelése. Jelen tudomásunk szerint az iszkémiás posztkondicionálás enyhíti az akut reperfüziós károsodást. Ezen kívül hosszabb távú hatása is van. Zhao és munkatársai szerint a miokardiális iszkémia után elért infarktusz terület méretének csökkenése 24 órán át fennmarad. Ez a megfigyelés további bizonyítékkal szolgál arra a feltevésre, hogy a korai események befolyásolása a későbbi eseményekre is hatást gyakorol. Eredetileg iszkémiás posztkondicionálásnak nevezték a jelenséget, de talán jobb a jelzőt elhagyni, mivel még nem világos, hogy tényleg a reokklúziók, vagy pedig az ezeket követő rövid reperfüziós epizódok a jelentősebbek a protektív stratégia szempontjából.

A posztkondicionálás ráirányította a tudományos világ figyelmét a reperfüzióra, mint egy biológiailag aktív és terápiásan fontos célpontra. Továbbá a posztkondicionálás kapcsolatba hozható rapidan aktiválódó survival kinázokkal, ezzel is alátámasztva szerepüket a posztiszkémiás károsodás mértékének meghatározásában.

A posztkondicionálást egyre több laboratóriumban, különböző modelleken vizsgálják, mint pl. kis és nagy állatokon, in vivo, ex vivo perfundált szerveken, illetve sejttenyészetekben. A végső kihívást az jelenti, hogy a posztkondicionálás elméletét és kísérletes tapasztalatait a mindennapi klinikai gyakorlatba mi módon lehet átültetni.

Valószínűleg a posztkondicionálás az egész folyamat háttérében álló szisztémás gyulladáshoz való válaszreakció kialakulásának valószínűségére, illetve mértékére is kedvező hatást fejt ki. Az iszkémiás posztkondicionálás 45 perc vese iszkémiát követően egészséges állatokon csökkenti a TNF- α koncentrációját szérumban és a TNF- α pozitivitást vesepapillában. Jelen kísérletben az iszkémiás posztkondicionálással sikerült megfékezni a revaszkularizációt követő kezdeti folyamatokat, mind a lokális gyulladás, a vese-, mind a májkárosodás tekintetében. A posztkondicionált csoportban, melyet Wortmanninnal gátoltunk nem csökkent az iszkémia-reperfüziós károsodás. Arra következtethetünk, hogy a PI3K-Akt

útvonal jelentős szerepet játszik az iszkémiás posztkondicionálás jelátviteli mechanizmusában.

Összefoglalva tehát kísérletünkkel sikerült kimutatni azt, hogy a vese kirekesztéssel járó érműtétek során alkalmazott iszkémiás posztkondicionálással mérsékelhetők az iszkémia-reperfúziós károsodások.

A vesefunkciót tekintve nem bizonyult az iszkémiás posztkondicionálás jótékony hatásának kísérletünkben. A posztkondicionálás nem csökkentette szignifikánsan a szérumkarbamid-szintet, a szérumkreatinin-szint alapján ugyanolyan mértékű veseelégtelenség jött létre minden csoportban, tehát a rövidtávú klinikai kimenetelt nem befolyásolta. Eredményünk összefüggésben állhat a reperfúziós időtartam rövidegével.

További megfigyelésünk, hogy a hiperkoleszterinémia önmagában képes fokozni a TNF- α termelődést a vese tubulus hengerhám sejtjeiben és az erek simaizmában. A posztkondicionálás csökkenti az egészséges szervekben a TNF- α -szintet, azonban a hiperkoleszterinémias szervek esetében ez a hatás nem alakul ki.

Metabolikusan egészséges 6 hónapos Wistar patkányokban az öregedés során perifériás inzulinrezisztencia jött létre. Orális glükóz terhelés során nem csak inzulin felszabadulás figyelhető meg, hanem ezzel párhuzamosan a szérum-TNF- α -szint is megnő, és ezzel szerepet játszva az inzulinrezisztencia kialakulásában.

Célzott vese iszkémia-reperfúzió során megváltozik a máj antioxidáns rendszer aktivitása, melyre pozitív hatással van a posztkondicionálás.

Streptozotocin indukálta diabétesz mellituszban fellépő iszkémia-reperfúziós károsodások mértéke magasabb volt a kontroll csoporthoz képest, de nem befolyásolta azokat az iszkémiás posztkondicionálás, mint ahogy az inzulin alkalmazása a reperfúzió kezdetén sem. Az inzulinnal történő farmakológiai posztkondicionálás nem csökkentette az akut gyulladós reakciót. STZ diabétesz mellituszban szignifikáns különbséget az iszkémia-reperfúzió csoportban származó metszetekben mutattunk ki, ahol Banff Grade II súlyosságú multifokális tubuláris atrófiát tapasztaltunk a corticomedulláris átmenetben.

Mindezek alapján elmondható, hogy a kísérleteinkben vizsgált endogén adaptációt indukáló mechanizmus – az iszkémiás posztkondicionálás - jelentősen csökkenteni képes az iszkémia-reperfúzió során kialakuló oxidatív stressz mértékét és az ezzel párhuzamosan kialakuló gyulladós reakciót egészséges szervezetben.

Ennek jelentősége a klinikumban realizálódhat minden olyan műtétet követően, ahol megelőzően hipoxiás vagy iszkémiás területek keringésbe kapcsolása történik (ér- és szívsebészeti műtét, traumás végtagsérülések, transzplantáció).

Tehát hatékonyságát, gyorsaságát és egyszerűségét tekintve az iszkémiás posztkondicionálás alkalmas lehetőségnek mutatkozik sebészeti műtéteket követően a reperfúziós károsodások csökkentésére.

A módszer eredményességét sajnálatos módon megnehezíti, hogy egészséges, vagy beteg szervezetben kerül alkalmazásra, melyek közül kiemelendő a metabolikus zavarok és azok nagyszámban történő előfordulása (hiperkoleszterinémia, diabétesz mellitusz).

VII. ÖSSZEFOGLALÁS, ÚJ EREDMÉNYEK

Elsőként vizsgáltuk vese iszkémia-reperfúziós modellben az iszkémiás és farmakológiai posztkondicionálást metabolikus eltéréssel rendelkező patkánymodellekben.

I. a. 1,5 % koleszterintartalmú táppal 8 hét után, hím patkányokban hiperkoleszterinémiát és hipertrigliceridémiát alakítottunk ki.

b. Mindkétoldali vesehilus okklúziót követően, az iszkémiás posztkondicionálás 45 perc iszkémiát követően és 120 perc reperfúziót megelőzően csökkenti az oxigén szabad gyökök mennyiségét a teljes vérben, a szérumperoxid- és TNF- α -szintet, tehát az akut gyulladáshoz vezető reakciót.

c. A hiperkoleszterinémia már önmagában is képes indukálni az endogén védelmet. A hiperkoleszterinémiás patkányoknál fellépő iszkémia-reperfúziós károsodások mértéke alacsonyabb, önmagában képes fokozni a TNF- α termelődést a vese tubulus hengerhám sejtjeiben és az erek simaizmában.

d. Feltételezzük, hogy az NF κ B- és a MAPK-útvonalakat a hiperkoleszterinémia már a TNF- α receptor asszociált útvonal előtt indukálni képes. Így a korai válasz által lehetséges, hogy az iszkémia nem tud olyan szignifikáns gyulladáshoz vezető választ kiváltani.

e. A vesefunkciót tekintve nem bizonyult az iszkémiás posztkondicionálás jótékony hatásának kísérletünkben. A posztkondicionálás nem csökkentette szignifikánsan a szérumkarbamid-szintet, a szérumkreatinin-szint alapján ugyanolyan mértékű veseelégtelenség jött létre minden csoportban, tehát a rövidtávú klinikai kimenetelt (2 óra) nem befolyásolta. Eredményünk összefüggésben állhat a reperfúziós időtartam rövidejével.

II. a. 2% koleszterin, 0,5% epesav és 20% napraforgóolaj tartalmú táppal 2-es típusú diabétesz mellitust alakítottunk ki.

b. Orális glükóz terhelés során kimutattuk patkánymodellben, hogy nemcsak inzulin felszabadulás figyelhető meg, hanem ezzel párhuzamosan a szérum-TNF- α -szint is nő, szerepet játszva az inzulinrezisztencia kialakulásában. A korábban metabolikusan egészséges Wistar patkányokban az öregedés során perifériás inzulinrezisztencia jön létre.

c. Az iszkémiás posztkondicionálás csak a máj MDA szintben csökkenti az iszkémia-reperfúziós károsodásokat 90 perces iszkémiát, és 240 perces reperfúziót követően.

d. A SOD és GSH koncentrációja szignifikánsan csökken vese iszkémia-reperfúziót követően T2DM-ben, jelezve a fokozott gyöktermelésből származó felhasználódásukat.

e. A malondialdehid koncentrációja májszövetben szignifikánsan emelkedett volt a T2DM-es csoportban az egészséges kontroll csoporthoz viszonyítva.

III. a. Streptozotocinnal 1-es típust modellező diabétesz mellitust alakítottunk ki. Az iszkémiás posztkondicionálás 45 perc iszkémiát követően egészséges állatokon csökkenti a TNF- α koncentrációját szérumban és a TNF- α pozitivitást vesepapillában.

b. Az inzulinnal posztkondicionált csoportban és a Wortmanninnal gátolt iszkémiás posztkondicionált csoportban szignifikánsan emelkedett a koncentráció a reperfúzió végén. A PI3kináz gátlószere, a Wortmannin szignifikánsan csökkentette az iszkémiás posztkondicionálás jótékony hatását a kontroll csoportban. Arra következtethetünk, hogy a

PI3K-Akt útvonal jelentős szerepet játszik az iszkémiás posztkondicionálás jelátviteli mechanizmusában.

c. A fénymikroszkópos, HE metszeteken az egészséges csoportban nem találtunk különbséget csoportjaink között. Jablonksi 0-2 és Banff Grad I. fázisokat láttunk. Feltételezzük, hogy 2 óra reperfúziós időtartam, amikor eltávolítottuk a vesét, az iszkémia-reperfúzió időtartam rövideje miatt egy korai, egyéb fénymikroszkópos eltérésekkel járó fázis.

d. A streptozotocin indukálta diabétesz mellituszban szignifikáns különbséget az iszkémia-reperfúzió csoportban származó metszetekben mutattunk ki, ahol Banff Grade II súlyosságú multifokális tubuláris atrófiát tapasztaltunk a corticomedulláris átmenetben.

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom **Dr. Kürthy Máriának és Dr. Jancsó Gábornak**, akik negyedéves orvostanhallgató korom óta egyengetik tudományos munkámat. Időt és fáradságot nem kímélő rengeteg segítségükért, örökös biztatásukért.

Kiemelt köszönettel tartozom **Dr. Róth Erzsébet Professzor Asszonynak** az iránymutatásért, építő kritikai bírálatokért. A témaválasztástól egészen a disszertáció megírásáig hasznos tanácsokkal látott el, és megadott mindig, minden segítséget.

Szeretném köszönetemet kifejezni **Dr. Degrell Péternek** hasznos tanácsaiért, a sok türelmes óráért a mikroszkóp mellett, mely alatt bevezetett a vese szövettanának érdekes, lenyűgöző világába. („Ennél vakabb vizsgálat nincsen, még jó, hogy nyitva volt a szemem.”)

Köszönet **Dr. Lantos Jánosnak és Dr. Vida Mariannak** a laboratóriumi segítségért, hasznos tudományos észrevételekért, a rengeteg segítségért.

Köszönöm egykori TDK társaim, **Ranczinger Eszter és Dr. Kovács Dóra** segítségét, gondos, szorgalmas munkáját.

Köszönöm **Dr. Arató Endre, Dr. Sínay László, Dr. Mikolás Esztella és Prof. Dr. Weber György** támogató segítségét.

Köszönettel tartozom a Sebészeti Oktató és Kutató Intézet és Központi Állatkísérleti Laboratórium valamennyi munkatársának (**Bakainé Matus Iona, Buza Nikoletta, Fábián Ildikó, Karádiné Sztárai Mária, Kathleen De Roo, Pintérmé Henrich Éva, Tamás Zoltán**) a nélkülözhetetlen segítségért, és a munkámhoz biztosított kellemes és baráti környezetért. Szeretném kiemelni **Tóthné Fajtik Csillát** laboratóriumi munkában nyújtott segítségéért.

Az intézet volt és jelenlegi PhD hallgatóinak (**Dr. Takács Ildikó, Dr. Balatonyi Borbála, Kovács Viktória, Dr. Jávor Szaniszló, Dr. Ferencz Sándor, Dr. Horváth Szabolcs, Dr. Borsiczky Balázs**) egyéb témákban való együttgondolkodást és együttműködést.

Köszönet **Mindenkinek**, aki a fentiekben nem került felsorolásra, de segített a munkámban.

Hálásan köszönöm **Édesanyámnak, Testvéremnek, Családomnak és Barátaimnak**, hogy mindig mindenben mellettem állnak.

IX. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK (PUBLICATIONS)

Közlemények (original papers)

Arató E, Kürthy M, Sínay L, Kasza G, Menyhei G, Hardi P, Shafiei M, Ripp K, Szilágyi K, Takács I, **Miklós Z**, Bátor A, Lantos J, Kollár L, Róth E, Jancsó G. Effect of vitamin E on reperfusion injuries during reconstructive vascular operations on lower limbs. *Clinical Hemorheology And Microcirculation* 44:(2) pp. 125-136. (2010) [IF: 2,838]

Miklós Z, Kürthy M, Degrell P, Ranczinger E, Vida M, Lantos J, Arató E, Sínay L, Hardi P, Balatonyi B, Ferencz S, Jávor Sz, Kovács V, Borsiczky B, Wéber Gy, Róth E, Jancsó G. Ischaemic postconditioning reduces serum and tubular TNF-expression in ischaemic-reperfused kidney in healthy rats. *Clinical Hemorheology And Microcirculation* 50:(3) pp. 167-178. (2012) [IF: 3,398]

Előadáskivonatok, Konferenciaszereplések (abstracts, presentations)

Miklós Z, Kürthy M, Jancsó G, Degrell P, Ranczinger E, Lantos J, Ferencz S, Wéber Gy, Róth E. A poszt kondicionálás hatása az ischemia-reperfúzió okozta szövettani elváltozásokra hyperkoleszterinémias patkányokban. *Magyar Sebészet* 62:(3) p. 155/3. (2009)

Miklós Z, Kürthy M, Degrell P, Jancsó G. A poszt kondicionálás hatásainak vizsgálata a vese iszkémiás-reperfúziós károsodásaira kontroll és hiperkoleszterinémias patkányokban. *HMAA Balatonfüredi Nyári Diákkonferencia*, Balatonfüred. (2009)

Sínay L, Kürthy M, Arató E, Bátor A, **Miklós Z**, Szabó A, Kovács K, Kollár L, Róth E, Jancsó G. Iszkémiás poszt kondicionálás protektív hatásainak vizsgálata hasi aorta műtétet követő reperfúziós károsodásokban. *Érbetegségek* 16:(2) p. 62. (2009)

Miklós Z, Kürthy M, Degrell P, Ranczinger E, Lantos J, Sínay L, Arató E, Horváth Sz, Ferencz S, Wéber Gy, Róth E, Jancsó G. Effects of postconditioning on kidney ischemia/reperfusion injury in hypercholesterolemic rats. *Acta Biologica Szegediensis* 53:(1) pp. 39-72. (2009)

Kürthy M, **Miklós Z**, Jancsó G, Ranczinger E, Lantos J, Sínay L, Arató E, Horváth Sz, Ferencz S, Wéber Gy, Róth E. A poszt kondicionálás hatásának vizsgálata a vese ischemia-reperfúziós károsodásaira kontroll és hyperkoleszterinémias patkányokban. *Magyar Sebészet* 62:(3) p. 143. (2009)

Miklós Z, Ranczinger E, Róth E, Kürthy M, Jancsó G. A poszt kondicionálás hatásának vizsgálata a vese iszkémia-reperfúziós károsodásaira kontroll és hiperkoleszterinémias patkányokban. *Tudományos Diákköri Konferencia, Pécs*. (III. helyezés) (2009)

Kürthy M, Jancsó G, Ferencz S, Lantos J, **Miklós Z**, Ranczinger E, Balatonyi B, Horváth Sz, Takács I, Szalai M, Kiss K, Lahner M, Feiszt P, Wéber Gy, Róth E. A Diclofenac aggregációgátló hatásának in vitro összehasonlító vizsgálata izolált trombocitákon. *Cardiologica Hungarica*; 39: A70. (2009)

Kürthy M, Jancsó G, **Miklós Z**, Degrell P, Ranczinger E, Lantos J, Ferencz S, Horváth Sz, Wéber G, Róth E. Ischemic postconditioning reduces kidney damage in healthy but not in hypercholesterinaemic rats. *British Journal Of Surgery* 97:(Suppl. 4) p. S95. (2010) [IF: 4,444]

Kovács D, Ranczinger E, **Miklós Z**, Kürthy M, Keszthelyi Zs. Az inzulin trombocita funkcióra és szabadgyök termelésre gyakorolt hatásának összehasonlító vizsgálata I-es és II-es típusú diabéteszes betegek és egészséges véradók teljes vérében. *Tudományos Diákköri Konferencia, Pécs*. (2010)

Miklós Z, Degrell P. A szialsav felszaporodása diabéteszes nodularszklerózisban. *Tudományos Diákköri Konferencia, Pécs*. (II. helyezés) (2010)

Arató E, Sinay L, Kürthy M, Hardi P, Shaafiei M, **Miklós Z**, Róth E, Jancsó G. Protection of vitamin E on reperfusion injuries in reconstructive vascular operations. *British Journal Of Surgery* 97:(S4) p. 63. (2010) [IF: 4,444]

Németh M, **Miklós Z**. Beültethető defibrillátorral élő betegek távoli ellenőrzése. *Tudományos Diákköri Konferencia, Pécs*. (II. helyezés) (2010)

Kürthy M, Jancsó G, **Miklós Z**, Degrell P, Ranczinger E, Lantos J, Ferencz S, Horváth Sz, Balatonyi B, Jávör Sz, Wéber Gy, Róth E. Ischaemic postconditioning reduces renal ischaemia/reperfusion injury in healthy but not in hypercholesterinaemic rats. *Magyar Kardiológusok Társasága, Balatonfüred, MKT Tudományos Kongresszus*. (2010)

Miklós Z, Degrell P. Diabéteszes nodularszklerózisban felszaporodik a szialsav. *XVII. Tudományos Diákköri Konferencia, Marosvásárhely*. (2010)

Miklós Z, Ranczinger E, Németh M, Kürthy M, Jancsó G, Degrell P, Róth E. A poszt-kondicionálás hatásának vizsgálata a vese iszkémia-reperfúziós károsodásaira. *XVII. Tudományos Diákköri Konferencia, Marosvásárhely*. (2010)

Degrell P, **Miklós Z**, Berta G, Halmai R, Molnár G, Wittmann I. Kimmelstiel–Wilson diabeteses nodularis glomerulosclerosisban felszaporodik a szialsav. *Hypertonia és nephrologia*; 14 (Supplement 1): S1-S72. (2010)

Miklós Z, Kürth M, Lantos J, Vida M, Wéber Gy, Jancsó G, Róth E. Effect of kidney ischemic postconditioning and pharmacological post-treatment on in healthy and diabetic rats. *Acta Physiologica* 202:(Supplement 684) Paper 034. (2011) [IF: 0,821]

Miklós Z, Kürthy M, Lantos J, Vida M, Wéber Gy, Róth E, Jancsó G. Effect of kidney ischemic postconditioning and pharmacological post-treatment on plasma big Endothelin level in healthy and diabetic rats. *British Journal Of Surgery* 98:(S4) pp. 50-69. (2011) [IF: 4,606]

Kürthy M, **Miklós Z**, Kovács D, Ranczinger E, Jancsó G, Arató E, Degrell P, Kovács V, Balatonyi B, Róth E and Lantos J. Effect of hypercholesterolemia on glucose tolerance and endogenous adaptation to Ischemia/reperfusion kidney injury in rats. *2nd Central and Eastern Laboratory Animal Science (CEELA) Budapest*. (2012)

Könyvfejezet

Kürthy M, Jancsó G, Arató E, Sínay L, Lantos J, **Miklós Z**, Balatonyi B, Jávör Sz, Ferencz S, Ranczinger E, Kovács V, Kovács D, Verzár Zs, Wéber Gy, Borsiczky B, Róth E. Investigation of the oxidative stress, the altered function of platelets and neutrophils, in the patient with periferial arterial disease. In: T Forbes (szerk.) *Angioplasty Rijeka: InTech*, pp. 63-88.(2012)